

文章编号:1005-6947(2008)01-0016-05

· 肝肿瘤专题研究 ·

RFA 联合 TACE 和 HFH 对兔肝 VX2 肿瘤的作用

吴华平¹, 张国武¹, 唐荣¹, 乔正荣², 唐素荣², 徐渝²

(1. 重庆医科大学附属第一医院 血管外科, 重庆 400016; 2. 重庆市第八人民医院 外科, 重庆 400015)

摘要:目的 探讨射频消融(RFA)联合高频热疗(HFH),经动脉化疗栓塞(TACE)治疗兔肝 VX2 肿瘤的作用。方法 将兔肝 VX2 肿瘤模型分为:RFA + TACE + HFH 治疗组(A组),RFA + HFH 治疗组(B组),RFA + TACE 治疗组(C组)和 TACE + HFH 治疗组(D组)。观察各组治疗前后的血清谷丙转氨酶(ALT),肝脏热休克蛋白(HSP70)及脾脏树突状细胞(DCs)表达。结果 (1)ALT:在治疗组第1天均明显升高,A组升高幅度最大,14 d内恢复最慢;B组上升幅度最小,恢复最快($P < 0.05$)。(2)HSP70表达:A组治疗后明显上升,14 d时仍为最高;D组上升幅度最小,14 d时表达值最低($P < 0.05$)。(3)DCs表达:A,B组无明显差异($P > 0.05$),并且组内14 d和7 d时两者差异无显著性。C,D组明显低于其余两组,且下降较快($P < 0.05$)。结论 RFA + TACE + HFH能更好地激活HSP70和树突状细胞的表达,增加机体抗肿瘤免疫的能力,但同时损害肝功能最明显。联合运用时需综合考虑。

[中国普通外科杂志,2008,17(1):16-20]

关键词: 肝肿瘤/治疗; 射频消融; 化学栓塞,治疗性; 高频热疗

中图分类号:R 735.7

文献标识码:A

The effect of radiofrequency ablation combined with transcatheter arterial chemoembolization and high frequency hyperthermia on rabbit liver VX2 carcinoma

WU Huaping¹, ZHANG Guowu¹, TANG Rong¹, QIAO Zhengrong², TANG Surong², XU Yu²

(1. Department of Vascular Surgery, the First Affiliated Hospital, Chongqing Medical University, Chongqing 400016, China; 2. Department of Surgery, the 8th People's Hospital of Chongqing, Chongqing 400015, China)

Abstract: Objective To evaluate the effect of radiofrequency ablation (RFA) combined with high frequency hyperthermia (HFH) and transcatheter arterial chemoembolization (TACE) on rabbit liver VX2 tumor.

Methods Rabbit liver VX2 tumor models were divided into the following group: Group A, RFA + TACE + HFH; Group B, RFA + HFH; Group C, FA + TACE; Group D, TACE + HFH. The changes of ALT, hot shock protein 70 (HSP 70) expression of liver and dendritic cells (DCs) expression of spleen before and after therapy were observed. **Results** (1) ALT: value of ALT was markedly elevated on 1d after therapy in all groups, but was greatest in Group A and also was the slowest to recover at 14 d; the degree of elevation was least in Group B and was the fastest to recover ($P < 0.05$). (2) HSP70 expression: It was markedly elevated in Group A and was still the highest at 14 d; the degree of elevation was least in Group D and was the lowest at 14 d ($P < 0.05$). (3). DCs expression: There was no difference between Groups A and B at 14 d and 7 d ($P > 0.05$); and Groups C and D were markedly lower than the A and B group, and declined more quickly ($P < 0.05$). **Conclusions** RFA + TACE + HFH can effectively activate the expression of Hsp70 and DCs, and enhance antitumor immunopotency of the organism, but, at the same time, can most markedly damage liver function. Therefore, their combined use should be given an all-round consideration.

[Chinese Journal of General Surgery, 2008, 17(1):16-20]

Key words: Liver Neoplasms/ther; Radiofrequency Ablation; Chemoembolization, Therapeutic; High Frequency Hyperthermia

CLC number: R 735.7

Document code: A

收稿日期:2007-09-28; 修订日期:2007-12-12。

作者简介:吴华平,男,重庆医科大学附属第一医院硕士研究生,主要从事肿瘤微创治疗及血管方面的研究。

通讯作者:乔正荣 E-mail:qiaozhengrong@hotmail.com

射频消融(radiofrequency ablation, RFA)和经肝动脉化疗栓塞(transcatheter arterial chemoembolization, TACE)是对不能进行手术切除的肝癌的治疗方法,已有研究证实两者有协同作用^[1-2]。高频热疗(high frequency hyperthermia, HFH)可提高化疗放疗作用,提高人体免疫能力^[3-4]。目前,对肿瘤的治疗更倾向于有选择的综合疗法。本实验通过对兔肝VX2肿瘤的治疗,探讨3种方法序贯治疗肝肿瘤的可能性,为临床治疗选择提供实验依据。

1 材料与方 法

1.1 材 料

1.1.1 动物 新西兰白兔,体重2.0~2.5 kg,雌雄不限,由本校动物实验中心提供。

1.1.2 实验器材 HGGF-3 000型射频治疗仪和HG-2 000体外高频治疗仪系珠海和佳公司产品。另有B型超声仪,全自动生化分析仪。以上设备均由重庆市第八人民医院肿瘤微创治疗中心提供。

1.1.3 实验试剂 兔抗兔热休克蛋白(Heat shock protein 70, HSP70)亲化纯和抗体、鼠抗兔S-100 β 亲化纯和抗体、免疫组化SABC试剂盒、复合消化液、磷酸盐缓冲液、枸橼酸盐缓冲液等均购自武汉博士德生物制品公司。麻醉剂速眠新(为二甲苯胺噻唑、乙二胺四乙酸、盐酸二氢埃托啡和氟哌啶醇组成的复方制剂),购自长春军事医学科学院军事兽医研究所。40%碘油,10 mL/支,购自上海旭东海普药业有限公司。丝裂霉素,2 mg/支,购自浙江海正制药有限公司。VX2肿瘤荷瘤兔由我校超声研究所提供。

1.2 实验方 法

1.2.1 动物肝肿瘤膜型的建立 采用开腹包埋法接种成瘤法。动物经速眠新0.15 mL/kg方法全麻后,固定其四肢备皮,据范林军等报道方法建立兔肝VX2肿瘤模型,种植后3周肿瘤直径达20 mm左右,B超检测符合标准即可分组治疗,自然生存期约6~8周^[5]。

1.2.2 实验分组 共50只兔子,在建立肿瘤模型过程中死亡6只,2只移植肿瘤失败,余42只随机分为4组:RFA+HFH+TACE治疗组(A组,10只),RFA+HFH治疗组(B组,11只),RFA+TACE治疗组(C组,11只),HFH+TACE治疗组(D组,10只)。因综合治疗效果明显比单一效果好,故未设立对照组^[1-2,6]。

1.2.3 处理方法 治疗顺序:TACE→RFA→HFH。(1)TACE:速眠新麻醉后无菌条件下进

腹,插管成功后缓慢注入碘化油丝裂霉素乳剂0.2 mL/kg,(丝裂霉素0.5 mg/kg生理盐水溶解后再和定量碘油混成乳剂),30 s至1 min注射完毕,栓塞完成后检查肿瘤表面可见乳白色碘油沉积灶。(2)RFA治疗:麻醉手术方法同前,射频冷极针在肿瘤正中插入2~3 cm,保持针尖温度15~25℃,组织温度99℃,自动消融5~10 min(功率80~200 W);治疗区域组织质地变硬、颜色灰暗甚至发黑结束治疗。(3)体外HFH治疗:麻醉方法同前,治疗时间控制在15 min,局部温度控制在43℃,同时监测肛温,控制在41.5℃。术日,术后3 d各治疗1次共2次。所有组术后3 d肌肉注射青霉素10万U/kg,每日2次。

1.2.4 标本采集时间 术后1,7,14 d取耳缘静脉血查血清谷丙转氨酶(alanine aminotransferase, ALT)。7 d随机每组各选择5只动物,麻醉后取肝肿瘤消融边缘区0.5 cm处的组织,D组取肿瘤边缘区0.5 cm处的组织;同时取脾脏,4%多聚甲醛溶液固定,石蜡包埋。14 d时同法处理各组余下动物。

1.2.5 病理检查 所取标本行连续切片,厚5 μ m,常规脱蜡至水,每一标本作一张HE染色。每个指标行免疫组织化学制作5张切片,均采用免疫组化SABC法(步骤按产品说明书进行)。S-100 β 蛋白采用酶消化,HSP70采用枸橼酸盐(0.01 mmol/L, pH6.0)抗原热修复。用已知阳性切片作阳性对照,用PBS代替一抗作阴性对照。S-100 β 蛋白在细胞质和/细胞核表达;HSP70主要在细胞质表达,部分细胞膜和细胞核也可表达。

1.2.6 结果分析 检测脾脏S-100阳性的树突状细胞(dendritic cells, DCs),400 \times 镜下随机选择5个不重复视野计数,结果采用的浸润密度以单位面积(每高倍视野)DC数表示。HSP-70均在同一条件下Olympus显微采集系统采集图像。分析软件采用image-pro plus 5.0,随机选取5个视野,计算累积光密度值(integrated optical density, IOD)。

1.3 统计学处理

实验结果用均值 \pm 标准差表示。统计分析软件采用SPSS11.5。数据经对数转换后服从正态分布且方差齐同者采用重复设计的方差分析进行多组间各参数的比较,两两比较采用SNK法;不服从正态分布者,采用成组设计多样本比较的秩和检验进行多组间参数的比较。两两比较采用多个样本两两比较的秩和检验。

2 结果

2.1 治疗后血清 ALT 变化

所有治疗组转氨酶在术后第1天明显升高。B组在第1天升高幅度最小,7,14 d下降幅度最大,均低于其他各组($P < 0.05$);A组升高最高,在1,7,14 d时与B,D组差异明显($P < 0.05$),与C组差异不显著;D组在各时段与各组亦有差异($P < 0.05$)(表1)。

表1 各组动物治疗后血清的ALT变化情况(U/L, $\bar{x} \pm s$)

	第1 d	第7 d	第14 d
A组	368.00 ± 30.28 ^{1),2)}	163.20 ± 19.14 ^{1),2)}	65.00 ± 9.27 ¹⁾
B组	131.36 ± 13.59 ^{2),3)}	64.64 ± 9.92 ^{2),3)}	30.80 ± 6.45 ^{1),3)}
C组	385.27 ± 15.37 ^{1),2)}	154.45 ± 17.43 ^{1),2),3)}	67.20 ± 5.26 ¹⁾
D组	337.20 ± 15.89 ¹⁾	137.00 ± 12.59 ^{1),3)}	51.2 ± 8.87 ¹⁾

注:1)与B组比较, $P < 0.05$;2)与D组比较, $P < 0.05$;3)与同组内14 d比较, $P < 0.05$

2.2 HE 染色形态学变化

在A,B,C组大体瘤体较治疗前有明显缩小呈灰白色,质地较硬,组织脆,中间破溃,呈凝固性坏死,有清晰的边界存在(图1),极少部分边缘有残余肿瘤存在。HE染色见肿瘤中心组织大片凝固性坏死,仅见组织轮廓。周围组织充血、出血明显。大量炎性细胞浸润、有纤维细胞明显增生(图2),灶性和碎片样坏死多见于小叶周边,而单个细胞的坏死主要见于肝小叶内,可见一些带有凋亡特征的肝细胞,中心区外的肿瘤组织中可见大量凋亡细胞,个别瘤体周边出现残存活肿瘤细胞。D组的肿瘤有部分坏死存在,肿瘤边界欠清,仍呈浸润生长(图3)。

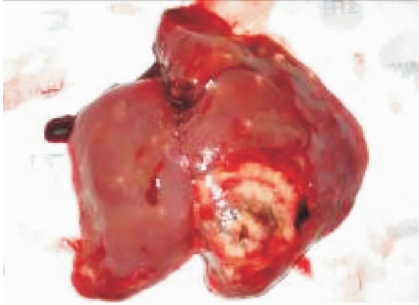


图1 RFA + HFH 术后7 d 肝脏大体标本 可见中心明显凝固性坏死,边缘清楚,未见明显复发灶

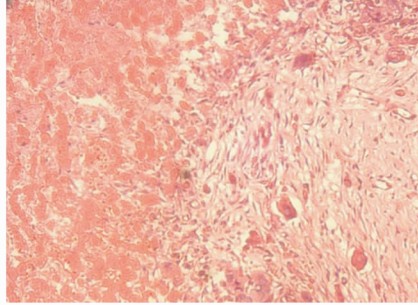


图2 RFA + HFH 术后14 d 肝脏 左侧为粉红色无结构区,右侧炎性细胞浸润及异物巨细胞反应,纤维组织增生明显(HE × 200)

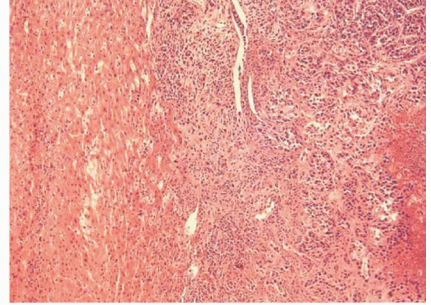


图3 TACE + HFH 术后7 d 肝脏 可见图中部肿瘤仍呈浸润生长,周围明显炎性细胞浸润,肝小叶结构破坏,右下可见凝固性坏死,呈均染红色无结构,左侧为紊乱肝小叶结构(HE × 100)

2.3 免疫组化结果

2.3.1 HSP70 在肝脏的表达 HSP70 在肿瘤中可过表达(图4),经治疗后,组织中HSP70表达明显增高(图5),A组HSP70升高幅度最大,

7 d时最高,7,14 d时与其他各组相比,差异均有明显($P < 0.05$);C,D组之间无显著性差异($P > 0.05$);D组与各组相比,升高幅度最小,差异明显(表2)。

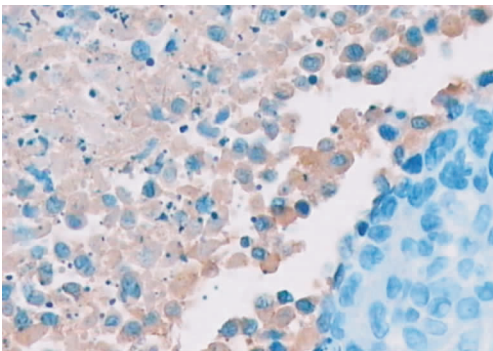


图4 肿瘤结节中心 HSP70 阳性肿瘤细胞,胞浆黄染,部分胞核染色(ABC × 400)

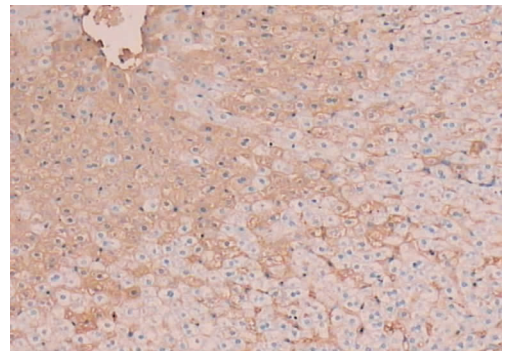


图5 RFA + TACE + HFH 术后7 d 肝脏 可见肝细胞胞浆内HSP70阳性,黄染,呈大片状分布(ABC × 200)

表2 HSP70表达的变化(累积光密度 IOD, $\bar{x} \pm s$)

	术后7 d	术后14 d
A组	6386.04 ± 1512.96	2722.04 ± 655.45 ¹⁾
B组	4390.30 ± 1084.17 ^{1),2)}	1412.68 ± 261.64 ^{1),2)}
C组	3570.366 ± 721.18 ^{1),2)}	1201.72 ± 198.71 ^{1),2)}
D组	3157.68 ± 405.36 ¹⁾	953.96 ± 215.775 ¹⁾

注:1)与A组比较, $P < 0.05$;2)与D组比较, $P > 0.05$;

2.3.2 S-100 β 阳性树突状细胞在肝脏和脾脏的表达 树突状细胞在肝脏主要以前体形式存在,数量稀少,治疗后仍能发现相当数量树突状

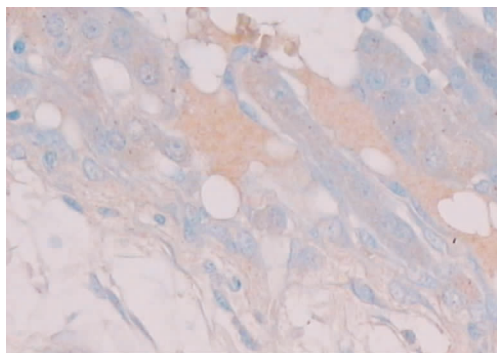


图6 RFA + HFH 术后14 d 肝脏 在肝脏纤维增生交界处,可见正常形态肝细胞及纤维组织增生,有两个形态不规则,胞体较大,有多个突起黄染细胞,为成熟形态 S-100 β 阳性树突状细胞(ABC × 400)

细胞存在,并在消融组织边缘发现成熟的树突状细胞,较周围肝细胞明显大,有树突突出,形状不规则(图6);脾脏的树突状细胞的大小形状和中等淋巴细胞大小相差不大(图7)。

本实验主要检测脾脏树突状细胞作统计分析,A组树突状细胞明显增多,14 d较7 d时降低,但无统计学意义。D组DCs数量明显低于其他各组,差异明显($P < 0.05$);在7 d和14 d时A,B组差异不明显($P > 0.05$);A,B组均显著高于C组($P < 0.05$)(表3)。

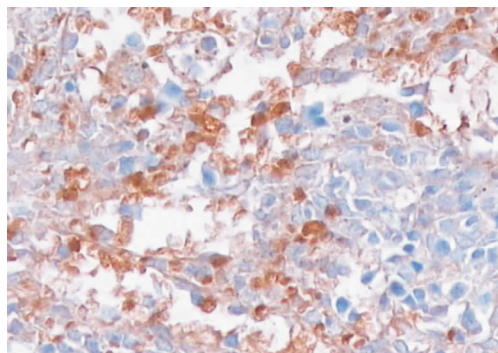


图7 RFA + HFH 术后7 d 脾脏 可见多个胞核胞浆明显黄染,S-100 β 阳性,胞体为中等淋巴细胞样(ABC × 400)

表3 各组树突状细胞的表达(个/每高倍视野, $\bar{x} \pm s$)

	术后7 d	术后14 d
A组	39.20 ± 12.86 ^{1),3)}	33.00 ± 9.94 ^{1),2)}
B组	34.866 ± 10.57 ^{1),3)}	31.00 ± 9.97 ^{1),2)}
C组	22.50 ± 8.58 ^{1),3)}	17.84 ± 6.12 ¹⁾
D组	11.20 ± 2.76 ¹⁾	6.96 ± 2.68

注:1)与D组比较, $P > 0.05$;2)与C组比较, $P < 0.05$;3)与组内14 d比较, $P < 0.05$

3 讨论

目前肿瘤的治疗趋势是多种方法联合应用,治疗手段增多,相应的副反应也增加。作为一种有效的治疗手段,RFA治疗对肝功能损害相对地小。TACE栓塞了部分肝动脉而减少肿瘤血供,同时化疗药物除了对肿瘤细胞作用外也会杀伤正常的肝细胞,两者结合对肝脏功能干扰比较大。从ALT可反映出肝脏急性损伤,本实验结果

显示B,C组在RFA基础上分别予以HFH或TACE治疗,两者在各时段肝功能恢复相差显著($P < 0.05$),说明TACE对肝功能干扰较大。C组ALT相对于D组差异明显,说明RFA对肝功能仍有较明显影响($P < 0.05$)。这提示在联合治疗时要考虑患者的承受能力,所谓微创也只是相对而言。

HSPs是一类高度保守的广泛存在于原核和真核生物中的蛋白质,通过抗原递呈细胞(Antigen present cells APCs),可活化机体特异性免疫和非特异性免疫反应^[7],HSPs中以HSP70, gp96作用最强。树突状细胞是机体内功能最强的APC,使机体产生特异性的抗肿瘤免疫应答。热休克蛋白(HSP)与DCs上特异性受体结合,诱导产生抗原特异性细胞毒T细胞并与Th1反应而发挥刺激宿主免疫反应的调节作用^[8-9]。热疗不仅可以使肿瘤细胞凋亡,而且促使肿瘤细胞产生大量

的 HSP^[10],热疗增加了 HSP 免疫原性,还使其从细胞浆转移到细胞核,同时它导致了浸润肿瘤的巨噬细胞的增加^[9]。通过检测这两种成分在治疗后的变化情况可间接推测机体免疫能力的变化情况。各组 HSP70 在治疗后 14 d 都有明显下降,到 14 d 时 A 组仍是表达最高,提示在 3 种方法联合使用的时候可以使其表达较高,在刺激抗肿瘤免疫能力方面可能作用更强。在 RFA 参与组, HSP70 表达相对为高,且与无 RFA 参与组差异明显,提示可能 RFA 治疗时肿瘤坏死明显,消融边缘肝细胞凋亡使 HSP70 表达增高。A 组与 B 组两时段树突状细胞表达均有明显差异 ($P>0.05$),但均比 C, D 组两组明显增多 ($P<0.05$)。提示 RFA 联合 HFH 可能使机体获得更持久的免疫能力。

Goldberg 等^[11]研究发现,许多血管活性物质通过收缩血管减少肝组织血流灌注而导致射频凝固坏死区增大。TACE 除直接引起肿瘤坏死外,还可有效减少肿瘤组织的血流灌注,其与射频有序联合应用后,将有可能进一步提高射频毁损的治疗效果,射频消融也将最大程度地杀灭碘油沉积区及病灶周围残存的肿瘤组织,两者相互弥补,使较大肝癌的完全坏死率明显提高。吴沛宏等^[1]报告 TACE 联合射频治疗效果明显优于单纯栓塞化疗。同时热疗联合 TACE 也可起到明显协同作用,孙雪飞^[12]报道两者联合治疗可明显提高晚期肝癌疗效,而又不增加介入化疗的副作用。RFA 时产生温度较高,主要使肿瘤细胞直接发生坏死,较低温度(43℃)可能对免疫功能起到更大的激活作用^[13],体外高频热疗正好能达到这点要求。三者联合产生协同作用,增强对肿瘤的杀伤。

本实验表明, HFH + RFA + TACE 组无论是树突状细胞表达还是 HSP70 的表达,明显较其他组高,均有统计学意义,提示序贯治疗可能在促进免疫能力方面有较好的作用。但同时它会加大对肝功能的损害,这是值得注意的。

参考文献:

- [1] 吴沛宏,张福君,赵明,等. 肝动脉栓塞化疗联合 CT 导向射频消融术治疗中、晚期肝癌的评价[J]. 中华放射学杂志, 2003, 37(10): 901 - 904.
- [2] 张立辉,崔忠,赵清涛,等. 射频联合肝动脉栓塞化疗及无水酒精注射治疗不能手术切除肝癌[J]. 中国普通外科杂志, 2002, 11(9): 525 - 527.
- [3] Ivarsson K, Myllymaki L. Heat shock protein 70 (HSP70) after laser thermotherapy of an adenocarcinomatransplanted into rat liver [J]. *Anticancer Res*, 2003, 23(5A): 3703 - 3712.
- [4] 王青,马庆久,鲁建国,等. 肝癌患者集束电极射频消融治疗前后 T 淋巴细胞及红细胞免疫功能的研究[J]. 中国普通外科杂志, 2003, 12(9): 682 - 685.
- [5] 范林军,何振平,马宽生,等. 兔肝 VX2 肿瘤移植模型的复制及其意义[J]. 中国普外基础与临床杂志, 2004, 11(1): 45 - 48.
- [6] 张盟辉,王玲巧,孔宪炳,等. 射频消融联合亚砷酸治疗兔肝 VX2 肿瘤的实验研究[J]. 中国普通外科杂志, 2007, 16(8): 770 - 773.
- [7] Basu S, Binder RJ, Ramalingam J, *et al*, CD91 is a common receptor for heat shock protein gp96, hsp70, and calreticulin [J]. *Immunity*, 2001, 14(3): 303 - 313.
- [8] Morse MA, Clay TM, Hobeika AC, *et al*. Phase I study of immunization with dendritic cells modified with fowlpox encoding carcinoembryonic antigen and costimulatory molecules [J]. *Clin Cancer Res*, 2005, 11(8): 3017 - 3024.
- [9] Kim TW, Lee JH, HeL, *et al*. DNA vaccines employing intracellular targeting strategies and a strategy to prolong dendritic cell life generate a higher number of CD8 + memory T cells and better longterm antitumor effects compared with a DNA prime-vaccinia boost regimen [J]. *Hum Gene Ther*, 2005, 16(1): 26 - 34.
- [10] Murthy R, Honavar S G, Naik M, *et al*. Thermochemotherapy in hereditary retinoblastoma [J]. *Br J Ophthalmol*, 2003, 87(11): 1432.
- [11] Goldberg SN, Hahn PF, Halpem EF, *et al*. Radiofrequency tissue ablation: effect of pharmacologic modulation of blood flow on coagulation diameter [J]. *Radiology*, 1998, 209(3): 761 - 767.
- [12] 孙雪飞. 热疗联合介入治疗晚期肝癌的临床研究[J]. 肿瘤学杂志, 2006, 12(2): 145 - 147.
- [13] Milani V, Noessner E. Effects of thermal stress on tumor antigenicity and recognition by immune effector cells [J]. *Cancer Immunol Immunother*, 2006, 55(3): 312 - 319.